

**METHOD AND REAGENT FOR DETECTION OF ENDOTOXINES OR beta -1,3  
GLUCANES FROM FUNGUS OR BACTERIA**

Patent number: WO8302123

Publication date: 1983-06-23

Inventor: SOEDERHAELL KENNETH TORD (SE)

Applicant: SOEDERHAELL KENNETH TORD

Classification:

International: C12Q1/38; C12Q1/56

European: C12Q1/02; C12Q1/37; G01N33/579; C07K5/08A1B

Application number: WO1982SE00430 19821217

Priority number(s): SE19810007599 19811217

Also published as:

EP0096689 (A1)

SE431228 (B)

Cited documents:

US4301245

DE2740323

EP0041089

EP0056210

**Abstract of WO8302123**

Method of detecting a fungal or bacterial infection by contacting a sample to be tested with (A) a blood cell lysate from a crustacean or an insect and (B) a detector substance in the form of a peptide compound having a specific terminal group, which through the enzymatic action of a blood cell lysate obtained from such an animal and activated by a bacterium or a fungus may be cleaved off to form a physically or chemically detectable compound. The invention also relates to a reagent or a reagent kit comprising said blood cell lysate and detector substance.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
 ⑫ 公表特許公報 (A)

⑪ 特許出願公表

昭58—502082

⑬ Int. Cl.<sup>7</sup>  
 C 12 Q 1/04  
 1/38  
 C 12 Q 1/56

識別記号

庁内整理番号  
 8213—4B  
 8213—4B  
 8213—4B

⑭ 公表 昭和58年(1983)12月8日

部門(区分) 1(1)  
 審査請求 未請求  
 予備審査請求 未請求  
 (全 7 頁)

⑮ 細菌及び菌類の検出のための方法及び試薬

⑯ 特 願 昭58—500092  
 ⑰ 出 願 昭57(1982)12月17日  
 ⑱ 翻訳文提出日 昭58(1983)8月17日  
 ⑲ 国際出願 PCT/SE82/00430  
 ⑳ 国際公開番号 WO 83/02123  
 ㉑ 国際公開日 昭58(1983)6月23日  
 ㉒ 優先権主張 ㉓ 1981年12月17日 ㉔ スウェーデン(SE)  
 ㉕ 8107599—6  
 ㉖ 発 明 者 ゼーダーヘル・トルド・ケネス

⑯ 出 願 人 スウェーデン国エス—752 63ウブサラ  
 ・ノレンス・ヴェーク87  
 ゼーダーヘル・トルド・ケネス  
 スウェーデン国エス—752 63ウブサラ  
 ・ノレンス・ヴェーク87  
 ㉗ 代 理 人 弁理士 米原正章 外2名  
 ㉘ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH  
 (広域特許), DE(広域特許), FR(広域  
 特許), GB(広域特許), JP, LU(広域  
 特許), NL(広域特許), SE(広域特許),  
 US

20

試 薬 の 範 囲

1. 試験されるべきサンプルを、(4)節足動物綱甲殻類  
 (Crustacea) 及び昆蟲綱(Insecta) の一つに属する  
 動物からの血球細胞分解産物またはそれらから単離され  
 た活性化可能なセリン・プロテアーゼもしくはプロテア  
 ーゼ類、及び例下式  

$$R_1-X-Arg-R_2$$
 ここで、 $R_1$ はそのN-末端で保護され、少なくとも二つ  
 のアミノ酸単位を有するペプチド部分であり、XはGly  
 またはAlaであり、また $R_2$ は炭酸アミド及び/又はエステル  
 結合を通してArgで表わされるアルギニン残基のC-  
 末端に結合した残基であつて、内毒素または $\beta$ -1,3-  
 グルカンにより活性化された血球細胞分解産物の存在下  
 で $R_2$ に酵素的に加水分解せられるものである。  
 のペプチド化合物の形態にある抽出物質及び/又はそれ  
 らの酸塩基と接触させ、物理的にまたは化学的に検出さ  
 れうる化合物好ましくは蛍光性もしくは発色性化合物で  
 ある形成された $R_2$ を決定することを特徴とする、内毒  
 素及び $\beta$ -1,3-グルカン類をそれぞれ検出もしくは  
 決定することにより菌類及び/又は細菌を検出する方法。  
 2. 血球細胞分解産物が、十脚綱の目に属する動物から  
 の血球細胞分解産物であることを特徴とする請求の範囲  
 第1項に記載の方法。

21

3. 血球細胞分解産物が炭水ザリガニ、特にアスタカス  
 アスタカス *Detonula detonans* またはパンファスタカス  
 レニウスキャヌラス *Panipastacus leniusculus* から調  
 得されることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の方法。  
 4. 上記十脚綱がアスタカス・アスタカス *Detonula*  
*detonans*、パンファスタカス・レニウスキャヌラス  
*Panipastacus leniusculus*、アスタカス・レプトダクテ  
 イラス *Detonula leptodactylus*、アスタカス・パブリ  
 ス *Detonula pullipes*、オルコネクテス・リモサス  
*Oreconetes limosa*、キヤンパラス・アフィニス *Cambarus*  
*affinis*、プロキヤンパラス・クラカイ *Procambarus*  
*clarkii*、キヤンサー・パダラス *Canis pagurus*、カ  
 ーシナス・メーナス *Carcinus maenas*、ホマラス・ウ  
 ルガリス *Homarus vulgaris*、バリヌラス・ウルガリス  
*Palinurus vulgaris*、ネフロンプス・ノルヴェギカス  
*Nephrops norvegicus* 及びキヤリネクテス・サピダス  
*Callinectes sapidus* から選取されることを特徴とする  
 請求の範囲第2項に記載の方法。  
 5.  $R_1$ が $\beta$ -エトローアユリド、5-エトロー- $\alpha$ -ナフタ  
 ルアミド、 $\beta$ -ナフタルアミド、 $\alpha$ -ナフタルエステル、  
 $\beta$ -ナフタルエステル、インドキシルエステル、N-メ  
 テルインドキシルエステル、(4-メテル)アンペリフ  
 エリルエステルまたはレゾルフィンエステル系であるこ



なるユニークな血液システムを有する、古い原始の脊椎分枝の有節類または節足動物とみなされていた。上述した内毒反応は、従つて、この特定の動物種に限定されるべきものと信じられていた。従つて、例えばカブトガニのみが一つのタイプの血球を有し、一方、他の節足動物は固及び液に依存して3乃至9の別個の血球タイプを有する。しかしながら、この関係においてさらに重要な相違は、カブトガニのコアグロゲンが血球中にあり、一方、他の節足動物においては血漿中に含まれここで主たる凝集反応が同様に起るということが示されたことである。後者の場合には従つて血漿及び血球の両方に凝集活性化が要求されるだろうし、これは従つてカブトガニからのそれと同様な全く安定な活性化調剤の調製を不可能とするだろう。

しかしながら、本発明によれば、コアグロゲンと少なくとも一つのセリン・プロテアーゼが節足動物甲殻類及び昆蟲類の血球中に含有され、カブトガニにおけるのと同様に凝集反応の活性化に関わるということ、及び、従つて細菌性及び真菌性感染がこれらの動物からの血球または血球細胞分解産物を用いて質的にもまた量的にも決定できるということが見出された。これらの節足動物からの細胞分解産物は、リボ核酸またはLPSすなわち脂質内毒素により、並びに他のタイプの炭水化物、すなわち本質的に全ての菌類の細胞壁の部分である

好ましい、淡水十脚類並びに海生十脚類が使用できる。淡水ザリガニの例としては、アステカス・アステカス *Astacus astacus* (河ザリガニ)、ペンファステカス・レウスケユラス *Palaemonetes leuiscus* (信号ザリガニ)、アステカス・パリス *Astacus pallipes*、オルコネクテス・リモサス *Orconectes limosus*、アステカス・レプトダクティラス *Astacus leptodactylus*、キャンベラス・アフィニス *Cambarus affinis* (北米ザリガニ)、プロキャンベラス・クラークイー (*Procambarus clarkii*) が挙げられる。好適な海生十脚類の中では、キャンサー・パダラス *Cancer pagurus* (普通のまたは食用のカニ)、カーシナス・メーナス *Carcinus maenas* (岸辺カニ)、ホマラス・グルガリス *Homarus vulgaris* (ロブスター)、パリスラス・グルガリス *Palaemon vulgaris* (とげロブスター)、ネフロプス・ノルゲシカス *Nephrops norvegicus* (ノルウェー・ロブスター)、キャリネタナス・サピダス *Callinectes sapidus* が挙げられる。これらの甲殻類の中でも、いくつかは水性養殖における養殖に直接に連なり、例えば河ザリガニや信号ザリガニであるが同様にロブスターやカニもそうであり、従つてこれらは本発明の目的に適している。

昆蟲類の中では、特に直翅類及び膜翅類(チョウ類)のものが挙げられる。最初に述べた目(もく)の例は、

メ-1, 3-グルカン類(M-1, 3-glucans)により定量的に活性化される。生化学的機構は完全に知られていないけれども、メ-1, 3-グルカン類は非常に特異的にセリン・プロテアーゼを活性化し、これがコアグロゲンをコアグリンに変換する他に、プロフェノールオキシダーゼを活性な酵素フェノールオキシダーゼに変換する。

本発明によれば、真菌性または細菌性感染は、このように、それ自体公知の方法において、試験されるべきサンプルを、一方では甲殻類または昆蟲類からの血球細胞分解産物またはそれらから分離された活性化可能なセリン・プロテアーゼもしくはプロテアーゼ類と、他方では細菌性もしくは真菌性抽出物により活性化されたこのような血球細胞分解産物による酵素作用を通して、物理的にあるいは化学的に抽出可能な化合物を形成しうる抽出物質と接触させ、上記化合物を決定することにより、素早くまた容易に検出する。従つて、真菌性または細菌性感染を検出しまたは決定するための相当する試薬または試薬キットは、一方では甲殻類または昆蟲類からの血球細胞分解産物及び他方ではこのような抽出物質からなる。

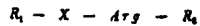
一般に全ゆる甲殻類及び昆蟲類からの血球細胞分解産物が本発明に従つて使用できるけれども、甲殻類(*crustacea*)の中でも十脚甲殻類もしくはいわゆる十脚類が

メキストセルカ・グレガリア(珍真バグ)及び移行バグ *Locusta migratoria* (普通のバグ)である。チョウ類の中では、ガレリア・メロネラ *Galleria mellonella* (ロウ蛾)、ヒヤルフォラ・セクロピア *Hyalophora cecropia* 及びギムビックス・モリ *Bombyx mori* (絹蛾)が挙げられる。昆蟲の場合は細胞分解産物のための利益が多分甲殻類と同じではないだろうがこの目的のためには例えば絹蛾の養殖は非常によく予期されるであろう。

例えば上述した甲殻類からの血球細胞分解産物が使用できるという事により、例えばザリガニからの血液リンベは年間幾んどの時期に収集できるので、非常に均一な品質を有する血球細胞分解産物が簡単にまた持続的に確保される。他方、カブトガニの血液リンベは非常に限られた期間だけ収集できるのみである。

前述したように、甲殻類及び昆蟲類からの血液リンベのための凝集プロセスは、少なくとも一つのセリン・プロテアーゼの活性化を含む。このような活性化セリン・プロテアーゼの存在により、以前に公知のリムラス細胞分解産物プロセスに使用されまたは提案されてきたものと本質的に同じタイプのペプチド化合物が使用できる。従つて、本発明は、抽出物質、すなわち活性化された細胞分解産物により置かれるべき物質が、下記式のペプチド化合物及び/又はそれらの酸塩塩である方法及び試薬

からなる。



ここで、 $R_1$ はN-末端で保護され、少なくとも二つのアミノ酸単位を有するペプチド部分であり、 $X$ はGlyまたはAla、好ましくはGlyであり、また $R_2$ はアミド及び/又はエステル結合を通してArgで表わされるアルギニン残基のC-末端に結合した残基であつて、細菌または菌類により活性化された血球細胞分解産物の存在下で $R_2$ に酵素的に加水分解されうるものである。

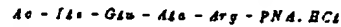
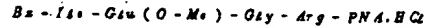
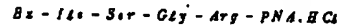
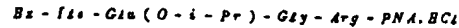
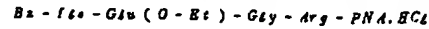
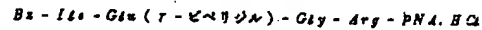
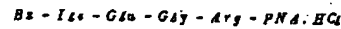
残基 $R_2$ はさらに、形成された化合物 $R_2H$ が物理的にまたは化学的に、例えば比色的にまたは分光光度測定的に測定されうるようなものであり、好ましくは蛍光性化合物または発色性化合物である。好ましくは、 $R_2$ はp-ニトロアニリド、3-ニトロ- $\alpha$ -ナフチルアミド、 $\beta$ -ナフチルアミド、 $\alpha$ -ナフチルエステル、 $\beta$ -ナフチルエステル、インドキシルエステル、N-メチルインドキシルエステル、(1-メチル)アンペリフェリルエステル及び/又はレゾルフィンエステルから誘導され、相当する化合物 $R_2H$ はp-ニトロアニリン、3-ニトロ- $\alpha$ -ナフチルアミン、 $\beta$ -ナフチルアミン、 $\alpha$ -ナフトール、 $\beta$ -ナフトール、インドキシル、N-メチルインドキシル、1-メチル-アンペリフェロン及びレゾルフィンである。これらのうち最初の二つの化合物は発色性であり、一方、他のものは蛍光化合物である。

でも文献に充分に記載されており、従つてここに詳細に説明する必要はないであろう。このように、例えば甲殻類からの部分的に精製された血球細胞分解産物が、血液の汚染を避けるように注意しながら、まず動物から血液を収集することにより調製される。ザリガニ、偽ザリガニなどのような水性環境で繁殖できる甲殻類を、血液を収集するときに殺す必要はないが、ヒト供血者の場合のように一定の間隔で同じ動物から幾度も収集できるということは注目されるべきである。このことはもちろん大きな利点である。なぜならば、本発明による血球細胞分解産物製造用の血液の回収は、そこで食用目的のザリガニと組み合わさるからである。血球は、ついで常法に従つて遠心分離及び洗浄を通じて単離される。これらは高カルシウムイオン濃度の緩衝液中で均質化された後、70,000 $\times$ で遠心分離され、上澄液が回収される。得られた細胞分解産物は、カプトガニからの現在市販の細胞分解産物よりも安定であり、少なくとも24時間安定に維持される。しかしながら、好ましくは、得られた上澄液は使用の際に水または適当な緩衝液(pH $\sim$ 8)で希釈されるように凍結乾燥される。溶液は任意に0.5 $\sim$ 1.5M NaClで安定化でき、これにより幾日かの安定性が達成できる。同様に凍結乾燥した細胞分解産物の溶液も少なくとも5時間安定である。凍結乾燥安定性を増大させるために、例えば牛血清アルブミン及び/

特表昭58-502082(4)

$R_1$ のための好適な保護基は、例えばベンゾイル、アセチル、カルボベンゾキリ、tert-ブトキシカルボニル及びp-トルエンスルフォニルである。

本発明のこの観点における使用のための特に好適なペプチド誘導体は、



である。ここで、Bz=ベンゾイル、Ac=アセチル、Me=メチル、Et=エチル、i-Pr=イソプロピル、及びPNA=p-ニトロアニリドであり、アミノ酸はIUPAC略号により与えられている。

ペプチド化合物の幾つかは市場で入手でき、一方、他のものは公知の方法で調製できる。

他の点においては、プロセスは、前述した西ドイツ公開公報2,740,323においてリムラス細胞分解産物法について記載されているようにして行なうことができる。

本発明による甲殻類及び昆虫類からの血球細胞分解産物は、本質的にはカプトガニからの周知のリムラス細胞分解産物と同様にして調製できる。この方法は、これま

又はグリシンを加えることができる。

真菌性及び細菌性感染を検出するための本発明に係る試薬または試験キットは、以上のように調製された血球細胞分解産物及び先に定義したような検出物質から構成できる。好ましくは、細胞分解産物及び検出物質は粉末形態にある。これを例えば袋いのある真菌性または細菌性感染を有する抽出物をテストするために用いるときには、テスト試薬は適当な緩衝液(pH $\sim$ 8)に溶かされ、ついでテストされるべき抽出物に加えられる。試験溶液は、ついで、使用された検出物質に依存して、例えば分光光度測定にあるいは比色的に検査される。

本発明の方法及び試薬はまた、内毒素決定用に公知のカプトガニ細胞分解産物と比べて、真菌性感染を検出するのに著しく敏感である。それらの細胞液中に $\beta$ -1,3-グルカンを含む全ての菌類が検出でき、これは殆んど例外なく検出する全ての菌類に適用される。本発明に従つて素速く真菌性感染を検出できるということは大きな価値がある。現在、ヒト及び動物における真菌性皮膚感染は増進され、これは約2週間かかっている。同様に、食物における真菌感染、いわゆるマイコトキシン類は急速に大きな問題となつていく。

本発明による甲殻類からの細胞分解産物を用いてこれまで得られた感度は、内毒素(細菌性感染)に対して約 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  g/ml、 $\beta$ -1,3-グルカン(真菌性感

染)に対して約 $10^{-10}$  g/m<sup>2</sup>である。内毒素に対する感度は、例えば市販のカプトガン細胞分解産物で現在行なわれているものに類似して、細胞分解産物に含有されるといことが示された内毒素活性化の抑制物質を除去することにより、おそらくさらに増大せらる。

血球細胞分解産物は、過剰の $\beta-1, 3$ -グルカン類を加えることにより、内毒素特異性が付与される。相応するやり方において、 $\beta-1, 3$ -グルカン特異性は、ザリガン細胞分解産物から純粋な形態で製造された抗-内毒素因子を加えることにより達成され、これはそこでザリガン細胞分解産物の内毒素活性を妨げるであろう。選択的に、高含量の内毒素(LPS)が加えられる。

本発明の方法によつて内毒素及び $\beta-1, 3$ -グルカン類の定量的決定は、それ自体公知のやり方で、例えば標準あるいは検量曲線を準備することによつて行なうことができる。

幾つかの特定の実施例によつて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明をいかなる意味においても限定するものでない。

#### 実施例 1

##### 血球細胞分解産物の調製

ザリガン、アスタカス・アスタカス *Astacus astacus* からの血球を、0.1 M クエン酸ナトリウムを除いた

るために加え、逆置されたフーネトロアニン(PNA)を405 nm で分光光度法により測定した。

用いた $\beta-1, 3$ -グルカン類は、Zo (酵母細胞壁の1%濃度の上液液、ツイメサン Zymosan, シグマ Sigma)、ラミナランM、ラミナランG及び $\beta-1, 3$ -D-結合グルコシル残基からなる直鎖五糖類であつた。ラミナランM及びGは、Stark S., J.R. (1976) *Carbohydr. Res.* **47**, 176-178に従つて、DEAE-セリブデン酸塩-セフアデプタス(Sephadex, 登録商標)クロマトグラフィーを使用してラミナラン(シグマ)から精製した。直鎖五糖類は、Soderhall, E., 及び Unestam, T. (1979) *Can. J. Microbiol.* **25**, 406-414に記載のようにより精製し、精製した。

特異的 $\beta-1, 3$ -グルカン活性化を示す顕著活性決定(セリン・プロテアーゼ)の結果を、下記第1表に示す。

特許58-502082(5)

以外は Soderhall, E., Hall, L., Unestam, T. 及び Nyhlin, L. (1979) *J. Invertebr. Pathol.* **34**, 285-294に記載のようにより収集した。血球を100 mM CoCl<sub>2</sub>を含有するpH 7.0の10 mM カコジール酸ナトリウム中で均質化し、ホモゲネートを次いで70,000 gで20分間遠心分離した。およそ2 mgタンパク/m<sup>2</sup>を含有する得られた上清液は、直ちに使用するかまたは3 mMアリコートに凍結乾燥して使用できる。使用に先だつて、これは2 mg/mlの最終タンパク濃度まで煎留水3 ml中に溶解される。

#### 実施例 2

##### ザリガン血球細胞分解産物の

##### の $\beta-1, 3$ -グルカン活性化

血球細胞分解産物の特異的 $\beta-1, 3$ -グルカン活性化に関して本発明の方法をテストするために、実施例1で得られた血球細胞分解産物の2等量部を1等量部の $\beta-1, 3$ -グルカン類または他配第1表に与えられている濃度の他の炭水化物と20-22℃で30分間混合した。この反応混合物の100  $\mu$ lを、pH 8.0の0.1 M トリス-HCl-緩衝液600  $\mu$ l及び(スグエーゲン因、メルンダールのカピ・ペプテッド・リサーチ社から得た)合成ペプテッド Bz-Lys-Ole (L-ベリリン)-Gly-Arg-PNA, HCl 2 mM 溶液100  $\mu$ lに加えた。37℃で0.5時間インキュベートした後、50%酢酸100  $\mu$ lを反応を終了させ

第1表

ザリガン血球細胞分解産物におけるセリン・プロテアーゼの $\beta-1, 3$ -グルカン活性化				
グルカン	糖	混合量	測定(グルコース) 濃度, $\mu$ g/ml ( $\mu$ g/30 min)	結果(活性) 測定(グルコース) 濃度, $\mu$ g/ml ( $\mu$ g/30 min)
ライミゼン	$\beta-1, 6$ -結合を有する (1-3) $\beta$ -D-グルカン	50 ( $2 \cdot 10^{-4}$ -10 <sup>-5</sup> )	0	0.03
ライミナランM	マンニトールで誘導 (1-3) $\beta$ -D-グルカン	20	300	0.85
ライミナランG	グルコースで誘導 (1-3) $\beta$ -D-グルカン	20	300	0.99
ライミナラン-ベリリン	(1-3) $\beta$ -D-グルカン	5	300	0.99
試験した 他の炭水化物			300-1600	0.95 検出され なかつた

\*試験した他の炭水化物はヤラン、セロロース、デキストラン、グルコース及びマンニトールでもあつた。

## 実施例 3

実施例 1 の菌体乾燥した血球細胞分解産物を、 $pH \approx 0$  の 0.1 M トリス-HCL-緩衝液 3 ml 中に溶かした。この溶液をついで実施例 2 に従つてフイコサン上澄液 1.5 ml と混合し、20℃で 30 分間インキュベートした。この反応混合物から 100  $\mu$ l を取り、0.1 M トリス-HCL ( $pH \approx 0$ ) 500  $\mu$ l に加えた。(スウェーデン国、メルンダールのカピ・ペプテド・リサーチ社から得た) 発色性末端基を有する各種合成ペプチド 2 mM 溶液 100  $\mu$ l をこの混合物に加え、37℃で 1 時間インキュベートした後、50 多肽 100  $\mu$ l を加えて反応を終了させた。ついで、遊離した  $p$ -ニトロアミンを 405 nm で分光光度法により測定した。各種発色性物質に対する結果を、下記第 2 表に示す。

以下余白

*Penicillium viridicatum*, カンジダ・アルビカンズ  
*Candida albicans*, メリボラス・アンノサス *Polyporus ananorus*, ボレタス・ヴァリエガタス *Boletus variegatus* について、溶液を 405 nm で比色法により測定した。全ての菌株に対して、黄色が得られ、 $p$ -ニトロアミンの  $p$ -ニトロアミンへの酵素加水分解と関連して血球細胞分解産物の活性化を指示した。

## 実施例 5

実施例 1 の血球細胞分解産物 100  $\mu$ l、各種濃度の *B. coli* 内毒素 (米国、マリントロット社製、Mallinckrodt Inc.) 100  $\mu$ l、 $pH \approx 0$  の 0.1 M トリス-HCL 100  $\mu$ l、及び (スウェーデン国、メルンダールのカピ・ペプテド・リサーチ社製)  $Bz-Ile-Glu(r\text{-ビベリジン})-Gly-Arg-PNA.HCL$  の 2 mM 溶液 100  $\mu$ l の混合物を 37℃で 30 分間インキュベートした。ついで、反応を終了させるために 50 多肽 100  $\mu$ l を加え、ついで遊離された  $p$ -ニトロアミンを 405 nm で分光光度法により測定した。得られた分光光度変化を第 3 表に示す。

以下余白

## 表 2

予め活性化したザリガニ血球細胞分解産物による各種発色性物質の加水分解

発色性物質	酵素活性 ( $\Delta d_{405}/30 \text{ min.}$ )
$Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.62
$Bz-Ile-Glu(r\text{-ビベリジン})-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.84
$Bz-Ile-Glu(O-Et)-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.84
$Bz-Ile-Glu(O-i-Pr)-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.92
$Bz-Ile-Ser-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.90
$Bz-Ile-Glu(O-Me)-Gly-Arg-PNA.HCL$	0.70

## 実施例 4

0.01 M カコジール緩衝液 ( $pH 7.0$ ) 中の実施例 1 のザリガニ血球細胞分解産物及び同量 (約 100  $\mu$ l) の  $Bz-Ile-Glu(r\text{-ビベリジン})-Gly-Arg-PNA.HCL$  からなる本発明の試薬を、以下の菌株の予め加熱 (5 分、100℃) した抽出物と混合した：アファノミセス・アキタシ *Aphanomyces astaci*, アファノミセス・レヴィス *Aphanomyces levis*, アファノミセス・ユナイテス *Aphanomyces utahensis*, サツカロミセス・セレイゼ *Saccaromyces cerevisiae*, アスペルギルス・フレグス *Aspergillus fragilis*, ペニシリウム・ヴィリジカタム

## 表 3

内毒素濃度 ( $\mu$ g/ml)	$\Delta d_{405}/30 \text{ min.}$ / 血球細胞分解産物 100 $\mu$ l
$1 \times 10^{-6}$	0.64
$1 \times 10^{-7}$	0.53
$1 \times 10^{-8}$	0.18
$1 \times 10^{-9}$	0.058
対照	0.030

## 実施例 6

実施例 1 と同様にして、以下の甲殻類から血球細胞分解産物を調製した：

ペリファステクス・レウスキウス	<i>Periphastrax leuiscus</i>
アスタクス・パリアス	<i>Astacus pallipes</i>
アスタクス・レプトダクティルス	<i>Astacus leptodactylus</i>
オルコネタス・リモサス	<i>Oreosmetes limosa</i>
キャンサー・パダス	<i>Cancer pagurus</i>
カーニクス・メナス	<i>Carinix menes</i>
ネフロプス・ノルウェギカス	<i>Nephrops norvegicus</i>

得られた細胞分解産物を実施例 2 及び 5 に記載の方法と同様にして  $p$ -1, 3-グルカン及び内毒素による活性化について試験し、活性化 ( $p$ -ニトロアミンの遊離) が全ての細胞分解産物について指示された。

## 国際調査報告

昆虫類スカストセルカ・グレガリヤ *Schistocerca gregaria*, ガレリア・メロネラ *Galleria melonella*, ヒヤルフォラ・セクロピア *Hyalophora cecropia* 及び ボムビクス・セリ *Bombyx mori* からの血球細胞分解産物は、ここまではフェノールオキシダーゼの活性化についての試験され、上述した甲殻類細胞分解産物に関しては肯定的な結果が得られた。甲殻類と昆虫類との血液システム間の大きな類似性のために、また本発明に例示してフェノールオキシダーゼがセリン・プロテアーゼにより顕著に活性化されるということが見出されたことから、これらの昆虫細胞分解産物も同様に、上記試験において活性化されることが予期されねばならない。

International Application No. PCT/SE82/00430	
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification and, if applicable, secondary classification)	
C 12 Q 1/38 // C 12 Q 1/36	
2. FIELD OF INVENTION	
3. PRIOR ART (References cited by the applicant)	
IPC 3	C 12 Q 1/00, 34, 36, 38, 56
US Cl	422:4, 13, 23; 195:103.5
4. SUMMARY OF THE INVENTION (Brief description of the invention)	
SE, NO, DK, FI classes as above	
5. CLAIMS (Claims of the invention)	
Category	Character of Document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages
A	US, A, 4 301 245 (LINDSAY G AND O'BEIRNE A) 17 November 1981
A	OE, B2, 2 740 323 (SEIKACAKU KOGYO CO LTD) 25 October 1979
A	EP, A3, D 041 089 (DYNASCIENCES CORPORATION) 9 December 1981
E	EP, A3, D 056 210 (PHARMINDUSTRIE) 21 July 1982
A	WO, A, 82/02382
A	Patent Abstracts of Japan, Vol 5, No 102, C61, abstract of JP 56-42597, publ. 1981-04-20.
A	Chemical Abstracts Vol 94(1981), abstract No 2223q, FEBS Lett. 1980, 120(2), 217-20.
A	Chemical Abstracts Vol 94(1981), abstract No 131140u, Progr. Clin. Biol. Res. 1979, 29, 209-20.
6. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
7. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
8. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
9. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
10. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
11. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
12. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
13. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
14. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
15. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
16. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
17. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
18. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
19. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
20. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
21. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
22. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
23. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
24. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
25. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
26. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
27. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
28. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
29. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
30. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
31. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
32. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
33. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
34. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
35. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
36. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
37. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
38. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
39. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
40. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
41. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
42. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
43. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
44. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
45. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
46. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
47. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
48. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
49. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
50. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
51. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
52. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
53. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
54. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
55. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
56. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
57. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
58. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
59. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
60. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
61. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
62. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
63. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
64. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
65. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
66. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
67. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
68. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
69. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
70. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
71. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
72. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
73. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
74. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
75. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
76. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
77. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
78. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
79. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
80. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
81. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
82. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
83. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
84. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
85. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
86. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
87. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
88. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
89. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
90. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
91. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
92. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
93. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
94. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
95. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
96. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
97. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
98. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
99. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	
100. STATEMENT OF THE INVENTOR (Statement of the inventor)	

International Application No. PCT/SE82/00430

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Claim No.
A	Chemical Abstracts Vol 95(1981), abstract No 181776a, Clin. Chis. Acta 1981, 116(1), 83-8.	1
E	Chemical Abstracts Vol 96(1982), abstract No 83106v, Dev. Comp. Immunol. 1981, 5(4), 565-73.	1

Form PCT/ISA 210 (Sept. 1980) (October 1981)